

学校编码: 10384
学号: B200126011

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学
____博士____学位论文

铜绿微囊藻生理节律的检测
及生物钟基因的克隆与相关研究

Study on Circadian rhythm and clock genes in *Microcystis*

aeruginosa PCC7820

徐 虹

指导教师姓名: 徐洵院士

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 12 月

论文答辩时间: 2007 年 2 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

摘 要

生物钟是广泛存在于蓝藻、植物和动物细胞中的内源计时系统，它对各种代谢和行为的实时调控使机体能更好地适应环境日变化（如光照、温度和湿度等）。生物钟一般具有三个主要特点，即在稳恒条件下生物钟仍然能以近似 24h 的周期自由运行；光/暗和温度信号能重置生物钟时相；生物钟周期长度具有温度补偿性。

蓝藻是具有生物钟的最简单生物，当其生物钟周期与环境光/暗周期相近时，藻细胞具有更强的生存竞争优势。生物钟这种内源计时系统在蓝藻中普遍存在，并且能全面调控细胞代谢，如细胞分裂、固氮作用、光合作用、氨基酸吸收、碳水化合物合成和呼吸作用等。铜绿微囊藻是蓝藻水华形成的典型生物，因此对其生理代谢规律的研究将有助于对蓝藻水华的预测和预防。

为了研究铜绿微囊藻是否也和其它蓝藻一样具有生物钟昼夜节律系统，我们检测了 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 的光合作用速率、ATP 含量和细胞分裂的日变化规律。

通过氧电极法和生物发光法分别检测 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 的光合作用和 ATP 含量变化的结果表明，在光/黑（L/D）周期环境下该藻的光合作用速率和 ATP 含量都呈现明显的昼高夜低近似 24h 的周期性变化，这种近似 24h 昼夜节律变化在连续光照和不同温度条件下都能至少持续运行 3 个周期。这说明铜绿微囊藻的光合作用和 ATP 合成受到内源生物钟的控制，温度和光照的是生物钟昼夜节律的导引因子。通过对细胞数、细胞大小和细胞分裂素含量的检测发现，传代时间为 38.4h 的铜绿微囊藻的细胞分裂也呈现受生物钟调控的昼夜节律性，即在连续光照条件下，*Microcystis aeruginosa* PCC7820 的细胞分裂集中在 CT0-16 发生，而 CT16-24 细胞则主要进行生长作用。

为了深入研究铜绿微囊藻生物钟调控的分子机制，我们根据蓝藻钟基因的同源序列设计合成了简并引物，通过 PCR 和染色体步行的方法获得了 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 的 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 基因。*kaiA* 基因全长 1011bp，编码一个由 336aa 组成，分子量大小为 38.4KD 的蛋白；*kaiB* 基因全长 315bp，编码分子量大小为 11.8KD 的蛋白；*kaiC* 基因全长 1563 bp，编码蛋白分子量大小为

58.3KD。

将三种 *kai* 基因的原核表达产物经纯化后免疫小鼠，分别获得了抗 KaiA、抗 KaiB 和抗 KaiC 的抗血清，并利用这些抗血清对藻细胞中的 KaiA、KaiB 和 KaiC 的表达节律进行了检测，结果表明，在 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 中 KaiA 蛋白含量在昼夜周期的各个时相都保持较高含量，不呈明显的昼夜节律变化；而 KaiB 和 KaiC 蛋白含量及 KaiC 的磷酸化过程则呈现明显的昼夜节律性，其中 KaiB 含量与 KaiC 含量及 KaiC 磷酸化程度呈反相变化。

Kai 蛋白间及 Kai 与其它蛋白间的相互作用是昼夜节律计时产生的重要过程，而酵母双杂交系统是研究蛋白相互作用的常用方法。我们利用酵母双杂交系统检测了三种 Kai 蛋白间的相互作用，结果表明 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白自身及 KaiA 与 KaiC、KaiB 与 KaiC 之间都能发生明显的相互作用，而 KaiB 和 KaiA 之间我们没有检测到相互作用。

为了研究导引生物钟的环境信号的输入通路和生物钟昼夜节律的输出途径，我们利用酵母双杂交系统分别对 KaiA、KaiB 和 KaiC 间的相互作用蛋白进行了筛选，结果从基因组文库中我们筛到了 23 个与 KaiA 相互作用的蛋白，其中与蓝藻高度相关的有 9 个，分别为非核糖体多肽合成酶、高度保守的 DUF29 结构域、含 PAP-fibrillin 结构域的蛋白、高保守的 COG4995、TRCF、RNA_pol_Rpb1_4、Leu-Phe-trans、HELICc、含 RNA_pol_Rpb2_3 和 RNA_pol_Rpb2_6 的蛋白；与 KaiB 相互作用的蛋白 4 个，其中只有三个检索到了相关蛋白信息，分别为糖基转移酶，保守的假想膜蛋白和 etraacyldisaccharide 激酶；与 KaiC 相互作用蛋白 7 个，其中也只有三个检索到了蛋白信息，分别为 KaiA 蛋白羧基端序列，二氢尿嘧啶合成酶和假想蛋白。根据筛选和检索结果，我们推测 KaiA 对基因的转录节律调控可能是通过与控制 DNA 复制和转录的酶类发生相互作用来实现的；而 KaiB 则可能是通过与某些膜蛋白的相互作用锚定在膜上。

关键词：铜绿微囊藻；生物钟；昼夜节律；*kai* 基因；酵母双杂交

Abstract

Circadian clocks are endogenous biological timing processes that have been observed ubiquitously in organisms from cyanobacteria to green plants and mammals. Temporal regulation of various metabolic and behavioral activity by the clock is thought to be adaptive for organisms to survive under daily alteration in environmental conditions, such as light, temperature, and humidity. The circadian clock free-runs with an approximate 24h cycle even in the absence of external signals. Its phase can be reset by light, dark and temperature signals, and the circadian period are temperature-compensated.

Cyanobacteria are the simplest organisms known to have the circadian clock. They may benefit from having an internal clock on a similar light/dark cycle as the environment under competitive circumstances. The circadian clock system is universal among cyanobacteria, it has a global effect on cell metabolism, such as cell division, nitrogen fixation, photosynthesis, amino acid uptake, carbohydrate synthesis and respiration. *Microcystis aeruginosa* is typical special of bluealgae bloom which could bring about harmful ecological contamination. Therefore, it is important to study the circadian rhythm of *Microcystis aeruginosa* for predicting and preventing bluealgae bloom explosion.

To Understand whether *M. aeruginosa* also has endogenous timing mechanism, we studies the photosynthetic rates , ATP content and cell division in *Microcystis aeruginosa* PCC7820.

In *M. aeruginosa* PCC7820, the oxygen evolution of photosynthesis and the ATP content all showed a clear circadian rhythm in this unicellular cyanobacterium when the culture had been entrained under successive 12h/12h light/dark cycles. The rhythm persisted for at least three cycles under LL(continuous light condition). The increase and decrease in photosynthetic oxygen-production rate or ATP content corresponded to the light and dark period, respectively, of the L/D cycle treatment given previously. When two cultures were previously entrained 12h out of phase, the rhythm of photosynthesis or ATP content were also out of phase. The period of

rhythm was about 24h and insensitive to temperature . These observation demonstrate that photosynthesis and cellular ATP content in *M. aeruginosa* PCC7820 are controled by the circadian clock.

To ascertain whether the circadian oscillator regulates the timing of cell division in *M. aeruginosa* PCC7820, we measured the cell number, cell size and the content of cytokinin(iPAs) in cultures. The results showed that populations dividing at rates once per 38.4h manifested circadian gating of cell division, Since phases in which cell division slows or stop recured with a circadian periodcity. The data clearly showed that *M. aeruginosa* PCC7820 expressed robust circadian rhythms of cell division. Apparently *M. aeruginosa* PCC7820 cells are able to simultaneously sustain two timing circuits that express significantly different period.

To study regulation mechanism of circadian clock , a circadian clock gene cluster *kaiABC* was cloned from the cyanobacterium *M. aeruginosa* PCC7820. The *kaiA* gene is 1011 base pairs in length and encodes a 336 amino acid and 38.4-kD protein. The *kaiB* (315bp) and *kaiC* genes (1563 bp) encode 11.8-kD and 58.3-kD proteins, respectively.

To understand the behavior of Kai proteins in the cell, we quantitatively assessed the cellular abundance of these protein. The circadian variation in *Microcystic* cellular amounts of each Kai protein was determined every 4h under LL by western blot . The analysis of the western blot indicated that the abundances of KaiB and KaiC displayed high amplitude rhythms for at least 3 days under LL. The peaks of KaiB and KaiC levels occurred at CT 16 to 20 and CT 8 to 12, respectively. The phosphorylation of KaiC also showed robust circadian rhythm under LL. In contrast, KaiA level were relatively high at all phases, displaying little rhythm.

The protein-protein association among the Kai proteins and other proteins may be a critical process in the generation of circadian rhythms. The two-hybrid system is a powerful technique for detecting protein-protein interactions. To study Kai proteins function and find their interacting protein, the clock genes *kaiA*, *kaiB* and *kaiC* were subcloned into the bait vector pGBKT₇ and prey vector pGADT₇ of yeast two-hybrid system, respectively. Each of the three kai protein was expressed as a fusion with

either a DNA-binding protein or the transcriptional activation domain of Gal4. The filter assay for β -galactosidase demonstrated heterotypic(KaiA-KaiC and KaiB-KaiC) and homotypic interactions(KaiA-KaiA, KaiB-KaiB and KaiC-KaiC) in doubly transformed yeast cells that expressed two type of fusion protein. But the interaction between KaiA and KaiB wasn't found.

To isolate proteins that might interact with KaiA, KaiB or KaiC from *M. aeruginosa* PCC782, two genomic libraries pGADT₇-Sau3AI and pGADT₇-HapII were separately constructed and then screened. Finally, twenty-three positive clones interaction with KaiA were picked out. The sequencing and analysis showed that nine of them were related to cyanobacteria. They are non-ribosomal peptide synthase, DUF29, PAP-fibrillin, COG4995, TRCF, RNA_pol_Rpb1_4, Leu-Phe-trans, HELICc and RNA_pol_Rpb2_3- RNA_pol_Rpb2_6, respectively. While TRCF, HELICc , RNA_pol_Rpb1_4 and RNA_pol_Rpb2_3- RNA_pol_Rpb2_6 are enzymes related to DNA replication and transcription, we suggest that the interaction of KaiA with these enzymes is presumably important in regulating gene transcriptional rhythm.

KaiB interacted with glycosyltransferase, conserved hypothetical transmembrane protein and tetracyldisaccharide 4'-kinase. The first two proteins are both transmembrane proteins. Therefore, We suppose that the interaction of KaiB with membrane-association proteins might be important to its membrane localization. Three positive clones interaction with KaiC are C-terminal domain of KaiA , dihydrouridine synthase and hypothetical protein respectively.

Keywords: *Microcystic aeruginosa*; biological clock; circadian rhythm; *kai* gene; yeast two-hybrid.

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一部分 前言.....	1
一.粗糙脉孢菌生物钟研究进展.....	2
二.动物生物钟研究进展.....	5
三.植物生物钟研究进展.....	11
四.蓝藻生物钟研究进展.....	15
五.本项目研究意义.....	38
第二部分 研究部分	
第一章 铜绿微囊藻昼夜节律的研究	
一.材料	39
二.常用溶液配制.....	39
三.方法.....	40
四.结果与分析	
4.1 细胞生长速率.....	45
4.2 光合作用节律研究.....	46
4.3 ATP 含量变化研究.....	49
4.4 细胞分裂节律.....	51
五.讨论.....	56
第二章 铜绿微囊藻生物钟基因的克隆	
一.材料.....	59
二.常用溶液配制.....	60
三.方法.....	61
四.结果与分析	
4.1 <i>kai</i> 基因簇的克隆.....	65
4.1.1 简并引物的扩增.....	65
4.1.2 上游未知序列的扩增.....	66

4.1.3 下游未知序列的扩增.....	72
4.2 序列拼接和分析.....	74
4.2.1 序列拼接和阅读框分析.....	74
4.2.2 密码子使用分析.....	78
4.2.3 Kai 蛋白二级结构预测.....	80
4.2.4 氨基酸序列同源性分析.....	82
五.讨论.....	88
第三章 铜绿微囊藻钟蛋白表达节律的研究	
一..材料.....	92
二.常用溶液配制.....	93
三.方法.....	95
四.结果与分析	
4.1 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白的表达纯化.....	99
4.1.1 原核表达载体的构建.....	99
4.1.2 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白的表达纯化.....	100
4.2 多克隆抗体的制备和免疫检测.....	101
4.2.1 间接 ELISA 法检测抗体效价.....	101
4.2.2 Western Blotting 检测抗体特异性.....	102
4.3 Kai 蛋白表达节律分析.....	103
五.讨论.....	104
第四章 铜绿微囊藻 Kai 蛋白相互作用蛋白的筛选.....	106
一..材料.....	107
二.常用溶液配制.....	109
三.方法.....	110
四.结果与分析.....	115
4.1 重组质粒 PGBKT ₇ -kai 和 pGADT ₇ -kai 的构建	
4.1.1 重组质粒 PGBKT ₇ -kaiA 和 pGADT ₇ -kaiA 的构建.....	115
4.1.2 重组质粒 PGBKT ₇ -kaiB 和 pGADT ₇ -kaiB 的构建.....	116
4.1.3 重组质粒 PGBKT ₇ -kaiC 和 pGADT ₇ -kaiC 的构建.....	117

4.2 KaiA、KaiB、KaiC 与 GAL4-BD 融合表达的检测.....	118
4.3 KaiA、KaiB、KaiC 自激活活性和自身相互作用研究.....	119
4.4 酵母双杂交文库的构建.....	121
4.5 Kai 相互作用蛋白的筛选.....	123
4.6 阳性克隆测序结果分析.....	125
4.6.1 与 KaiA 相互作用的阳性克隆测序结果分析.....	126
4.6.2 与 KaiB 相互作用的阳性克隆测序结果分析.....	132
4.6.3 与 KaiC 相互作用的阳性克隆测序结果分析.....	133
4.7 A16 和 A26 与 KaiA 相互作用部位的确定.....	134
五.讨论.....	137
总结与展望.....	140
参考文献.....	142
致谢.....	161

前言

地球的自转和公转产生了周而复始的昼夜更替和季节变换,与之相适应,生物的体内生理活动和外在行为也表现出同样的周期节律性。从单细胞的分裂生殖到植物的光合作用、动物的激素分泌,都有昼夜节律性的存在,且这种昼夜节律普遍具有以下三个特点:(1)内在周期性和自我维持的特点,即昼夜节律是机体内部产生的以近似 24h 的周期自由运行,在失去规律外界信号刺激时,内在自主节律仍然能够以近于 24h 周期持续运行一段时间。(2)重置性(reset)。外界环境因子如光暗周期和温度能调整昼夜节律(生物钟)的位相,使其与外界环境保持同步。(3)温度补偿效应(temperature compensation),即昼夜节律周期在生理范围内对温度变化相对不敏感(Stal *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1999; Dunlap, 1999)。

由于这种昼夜节律现象从单细胞生物到多细胞生物,从原核生物到真核生物都普遍存在,因此关于它的特征、意义和机理研究日益受到人们重视,并已在各种生命水平上开展了对它的研究。而这些研究表明,生物体生命代谢活动所表现出来的这种昼夜节律受控于细胞内的生物钟。并且,随着近几十年分子生物学和遗传学研究技术的不断发展,人们对生物钟即昼夜节律的内在定时机制也进行了深入研究和理解。

目前已知生物的昼夜节律系统包括输入系统(input)、生物钟(biological clock)和输出系统(output)三个部分(图 1)。(1)输入系统是生物将外界环境的时间信号传入到生物钟从而导引(entrainment)生物钟的过程,由感受器和传入路径组成,主要授时因子是光照信号和温度。(2)生物钟是指可以产生自我维持的昼夜振荡机制,也称中央振荡器(central oscillator),由一组呈节律表达的基因及其编码的蛋白质组成。目前认为,昼夜振荡机制就是由钟基因和钟蛋白构成的一种“转录-翻译-抑转录”的反馈调节环。反馈环的正调控因子(positive element)通过 PAS 结构域(Per、Arnt、Sim 基因中发现的二聚化区域,是蛋白质相互作用界面,也是感光作用和钟基因聚合作用的重要结构,光受体与振荡器间通过 PAS 发生一些必要的联系。)相互配对,结合于钟基因上游的启动子的 E-box (CACGTG, 也称时钟盒,是 bHLH 蛋白结合位点)上,启动基因转录,进而翻译产生钟蛋白,而钟蛋白本身是负调控因子,当其达到一定浓度时能抑制自身基因的转录,从而使钟蛋白自身含量减少,反馈抑制作用逐渐减弱,最终完成一

个循环。该反馈调节环使钟蛋白的浓度以近 24h 周期进行振荡。(3) 输出系统是指生物钟将产生的时间信号传出到特定的组织,从而调节特定的生理代谢和行为的过程。包括与信号输出有关的钟基因和钟控基因 (clock-control genes) (Kondo *et al*, 1999; Young, 2000)。昼夜节律系统的三个组成部分并不是截然分开的,它们总是相互联系,相互影响,并在各组分之间存在重叠。

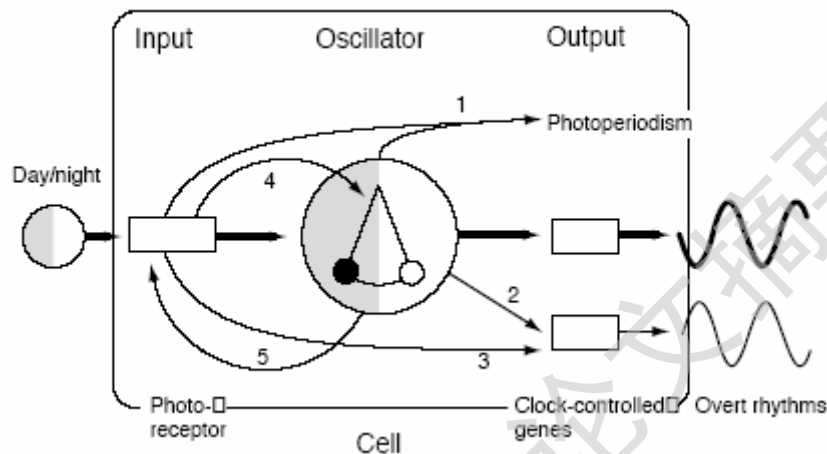


图 1. 昼夜节律系统示意图。昼夜节律系统由输入途径、振荡器和输出途径组成 (Kondo and Ishiura, 1999)。

Fig1 The basic circadian model. Circadian system are composed of an input, oscillator and output.(Kondo and Ishiura, 1999)

钟基因及其编码的蛋白质彼此相互作用,组成一个或多个反馈回路,以近于 24h 的周期进行振荡。光受体接受光-暗周期信号,经输入系统到达振荡器,再通过输出系统的基因及钟控基因,调节效应器的活动并与环境周期保持同步,这是不同种类生物的生物钟运行的普遍分子机制。但是不同生物其生物钟的运行又有其各自的特点,不能一概而论,下面我们就几种模式生物生物钟的研究状况进行综述。

一. 粗糙脉孢菌生物钟研究进展

脉孢菌 (*neurospora crassa*) 是真核单细胞生物,属于丝状真菌类,它的生命活动受光-暗信号和温度的影响而具有昼夜节律性,如其分生孢子的形成就具有明显的昼夜节律。由于脉孢菌属于单细胞生物,因此对它昼夜计时机制的研究开始较早,进展也较快,目前已克隆了 *frq*、*wc-1*、*wc-2*、*vivid* 和 *ck2* 等生物钟基因。

1.1 脉孢菌钟基因研究进展

frq (*frequency*) 基因是脉孢菌生物钟振荡器的核心组分, 它通过不同的ATG起始密码子编码长链(989个氨基酸)和短链(890个氨基酸)两种FRQ蛋白, 低温条件下有利于短链FRQ的形成, 高温条件下有利于长链FRQ的形成, 这样脉孢菌就通过FRQ的数量和两种形式FRQ的比率来实现温度补偿。FRQ蛋白是一种转录因子, 具有核定位信号(NLS)、螺旋-转角-螺旋(HTH)结构以及保守的酸性区和碱性区, 能形成同源二聚体, 该二聚体进入细胞核后通过负反馈作用抑制自身基因的转录, 由此构成的回路就是脉孢菌生物钟振荡器运作的中心环节(Aronson *et al*, 1994)。FRQ蛋白含量除了受上面所说的负反馈调节外, 还受磷酸化进程调控: FRQ在其生成的那一刻起就被磷酸化, 并且磷酸化过程能持续进行, 而过度磷酸化则引发FRQ蛋白通过泛素途径降解(He *et al*, 2003)。

WC-1 (White Collar-1)和WC-2 (White Collar-2)在脉孢菌的昼夜系统中发挥重要作用, 它们是具有PAS结构域和GATA型-锌指DNA结合结构域的转录因子。WC-1是蓝光受体, 能介导光波输入到*frq*基因启动子, 并根据光-暗周期校准生物钟位相; 它具有三个PAS结构域, N-端的PAS结构域属于特异的LOV(light, oxygen or voltage)-PAS家族, 能与生色团(可能是FAD)结合, C-端的PAS结构域能与WC-2相互作用, 形成异源WC-1/WC-2二聚体。WC-2是振荡器组成成分, 在确定周期长度和温度补偿方面起关键作用。WC-1和WC-2通过PAS结构域形成的异源二聚体能与*frq*基因和其他光诱导基因的启动子结合, 促进*frq*基因和光诱导基因的转录(Crosthwaite *et al*, 1997; Froehlich *et al*, 2002; Liu, 2003)。

VIVID蛋白是一种WC依赖型的蓝光受体, 含有类似WC-1的LOV-PAS结构域, 能与WC-1通过各自的PAS结构域相互作用, 形成VIVID/WC-1复合物, 从而阻断WC-1/WC-2复合物对*frq*基因和其它光诱导基因的激活作用。*vivid*的表达除了受光诱导和WC-1/WC-2复合物的调节外, 其自身表达产物VIVID还能通过抑制WC-1/WC-2复合物的活性来进行自我调控。此外, VIVID蛋白参与“门控”调节, 即在昼夜循环的某一阶段使生物振荡器对光照不敏感。脉孢菌依照光周期对生物钟进行校准也需要VIVID(Dunlap, 1999; Liu, 2003; 李经才等, 2004)。

CK2 (Casein kinase2, 酪蛋白激酶) 是最重要的FRQ蛋白磷酸化激酶之一。CK2基因突变后, FRQ蛋白呈低磷酸化状态, 其蛋白水平提高, 昼夜节律周期延

长。同时, CK2突变体中 frq mRNA水平、FRQ蛋白水平和钟控基因三者的昼夜节律消失, 由此推测CK2介导的磷酸化有降低FRQ蛋白的稳定性、减少FRQ蛋白和WC蛋白复合体形成及促进脉孢菌的昼夜节律负反馈形成的功能 (Yang *et al*, 2002)。除了CK2外, CK1 (Casein kinase1) 和CAMK-1 (calcium/calmodulin-dependent kinase) 也能促使FRQ蛋白磷酸化, 调节FRQ蛋白的稳定性 (Liu, 2003)。

1.2 脉孢菌生物钟反馈调节机制

脉孢菌以FRQ、WC-1和WC-2蛋白为核心组成昼夜节律反馈回路: 早晨光照时, 2个具有PAS结构域的转录因子WC-1和WC-2形成复合体与 frq 基因的启动子结合, 激活 frq 基因的转录, 4h后 frq mRNA达到峰值, 表达的FRQ蛋白形成同源二聚体通过与WC-1和WC-2复合体发生相互作用来抑制自身基因转录, 8h后 frq mRNA降至最低水平, frq 基因表达关闭, 而FRQ蛋白逐渐达峰值。FRQ蛋白从生成开始就被磷酸化, 随着其磷酸化程度的加深, 被过磷酸化的FRQ蛋白经由泛素途径降解。翌日黎明, frq 又被WC复合体激活, 昼夜循环重新启动。这样WC-1和WC-2蛋白复合物形成正反馈回路, 与FRQ蛋白的负性反馈回路相制约, 实现昼夜节律的启动与维持 (图2) (Young *et al*, 2001; Liu, 2003)。

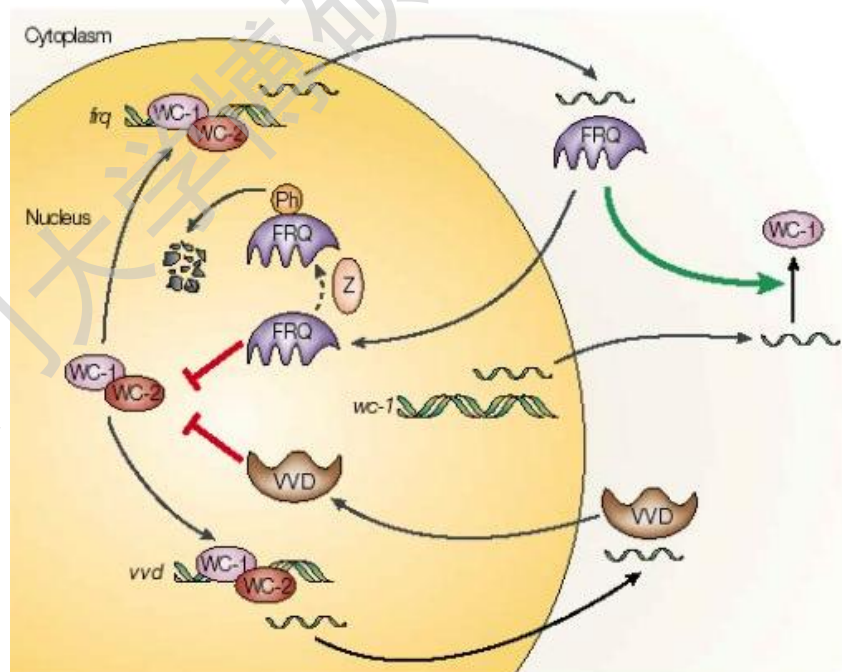


图 2. 脉孢菌生物钟反馈调节 (Young *et al*, 2001)

Fig2. Circadian clock of *Neurospora crassa*

在脉孢菌的输出系统中, 已发现十几个钟控基因 (clock control gene,

ccg) ,*ccg-4* 和 *ccg-6* 控制发育的昼夜节律, *ccg-1*、*ccg-9* 和 *ccg-12* 调节应激反应节律, *ccg-7* 在糖酵解通路发挥作用。这些基因失活不影响生物钟昼夜节律的正常运转, 但会导致某些生理活动节律消失。

虽然对于脉胞菌生物钟的研究已经很多, 但关于其生物钟的输入途径、钟蛋白的降解机制以及输出途径了解得还不是很清楚, 新的钟组分和钟基因还有待于发现和克隆。

二. 动物生物钟研究进展

多细胞生物具有中枢钟(主钟、母钟)和外周钟(细胞钟、子钟)。外周钟既受中枢钟的调节也可与中枢钟解偶联。中枢钟可在昼夜周期诱导下产生较强的昼夜节律, 这种节律通常可在恒定条件下维持两周以上, 而外周钟则只能在恒定条件下保持 4-5 天的节律性(Yazamaki *et al*, 1999;Berson *et al* ,2002;Cheng *et al*,2002)。中枢钟位于中枢部位, 能发出信息控制全身的节律活动, 不同进化阶段的生物其中枢钟所在位置不同: 无脊椎动物的中枢钟位于视网膜, 爬行类动物的中枢钟位于松果体(pineal gland), 果蝇中枢钟位于头部的昼夜节律性神经元, 哺乳动物中枢钟位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)。外周钟位于组织细胞内, 调控效应器的节律(Fukada *et al*,2002)。

由于果蝇具有遗传易操作性和经典的遗传杂交技术优势, 因此它成为昼夜节律研究最前沿的模式生物, 许多关于理解昼夜节律分子基础的重大突破都来自果蝇的研究。

2.1 果蝇生物钟的分子机制

果蝇中枢钟位于靠近视神经管的双侧对称的腹侧神经节(sLNvs)上(Helfrich *et al*,1996)。sLNvs 能通过两种途径感受光信号:(1) 由复眼上的感受器传入光信号;(2) 直接由透过几丁质表皮的光诱导其振荡效应(Helfrich *et al*,2001)。由于果蝇具有皮下感光机制, 所以其某些外周钟并不受中枢钟的导引和控制也可以产生很强的振荡节律(Emery *et al*, 1997)。

2.1.1 果蝇钟基因研究进展

果蝇钟基因的研究始于 20 世纪 70 年代, 目前已确认的主要钟基因有:*period(per)*、*timeless(tim)*、*Clock(Clk)*、*cycle(cyc)*、*vri(vri)*、*double-time(dbt)*、

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库